

Bakalářská práce

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích



Methicilin (oxacilin) rezistentní
Staphylococcus aureus
ve spádové oblasti laboratoře
Laboma v Českých Budějovicích

Jana Kantová

2010

Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář, CSc.

Bakalářská práce

Kantová Jana (2010): Methicilin (oxacilin) rezistentní *Staphylococcus aureus* ve spádové oblasti laboratoře Laboma v Českých Budějovicích. [Methicilin(oxacilin)-resistant *Staphylococcus aureus* in the attraction zone of Laboma's Laboratory in České Budějovice. Bc. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Bakalářská práce poskytuje základní přehled o morfologii, antigenních vlastnostech a genetické stavbě druhu *Staphylococcus*, zdůrazňuje význam multi- a methicilin-rezistentních kmenů ve zdravotnictví jako původců závažných nákaz vedoucích k prodloužení a komplikování léčby hospitalizovaných pacientů. Porovnáváním potenciálně patogenního kmene s běžným *S.aureus* ověřuje účelnost vybraných diagnostických mikrobiologických metod.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, za pomoci svého školitele a s využitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

České Budějovice, 29.duben 2010

.....
Jana Kantová

Poděkování:

Děkuji svému školiteli MUDr. Radimu Kramářovi, CSc. za poskytnuté odborné rady, asistenci při provádění praktických pokusů, podporu a značnou trpělivost po dobu naší spolupráce. Dále děkuji zaměstnancům společnosti Laboma s.r.o. v Českých Budějovicích, kteří mi byli nápomocni při získávání dat na půdě Mikrobiologické laboratoře.

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Charakteristika rodu Staphylococcus.....	1
2.1	Morfologie.....	1
2.2	Stavba buněčné stěny.....	1
2.3	Faktory virulence.....	2
2.3.1	Povrchové faktory.....	2
2.3.2	Extracelulární faktory.....	3
2.4	Metabolismus.....	6
2.5	Genetika.....	6
3.	Specifika Staphylococcus aureus.....	6
3.1	Lokalizace na lidském těle.....	6
3.2	Způsoby přenosu.....	7
3.3	Nosičství a epidemiologie.....	7
4.	Rezistentní kmeny MRSA.....	7
4.1	Vymezení rezistence.....	8
4.2	Genetika rezistence.....	8
4.3	Přenos rezistence.....	8
4.4	Mechanismy rezistence.....	9
4.5	Možné příčiny vzniku rezistence.....	10
4.6	Snížená citlivost a rezistence k vybraným antibiotikům.....	10
4.7	Nemocniční MRSA.....	11
4.7.1	Nosokomiální nákazy.....	11
4.7.2	Ranné infekce.....	13
4.7.3	Infekce krevního řečiště.....	14
4.7.4	Nosokomiální pneumonie.....	15
4.8	Komunitní MRSA.....	16
4.8.1	Komunitní pneumonie.....	16
4.8.2	Syndrom toxického šoku.....	16
4.8.3	Otravy jídlem.....	17
4.8.4	Kožní infekce.....	17
4.9	Léčba.....	18
4.9.1	Chirurgické zákroky.....	18
4.9.2	ATB terapie.....	18
4.10	Hygienická opatření.....	19
4.10.1	Izolace.....	19
4.10.2	Bariérová ošetrovací technika.....	19
5.	Laboratorní a diagnostické metody.....	20
5.1	Odběr materiálu.....	20
5.2	Transport vzorků.....	21
5.3	Kultivace.....	21
5.3.1	Optimální kultivační podmínky.....	21
5.3.2	Kultivační média.....	21
5.3.3	Hemokultury.....	22
5.4	Koagulázové testy.....	23
5.5	Latexová aglutinace.....	23
5.6	Mikroskopie.....	23
6.	Cíle práce.....	25

6.1	Vymezení spádové oblasti.....	25
6.2	Metody	25
7.	Výsledky	26
7.1	Grafické znázornění	26
7.2	Kultivace	29
8.	Diskuse	30
9.	Závěr.....	31
10.	Seznam použité literatury	32
11.	Přílohy.....	38

Seznam nejčastěji používaných zkratk a symbolů

AIN	amoxicilin + kyselina klavulanová
BAC	bacitracin
ERY	erytromycin
CIP	ciprofloxacin
CLI	klindamycin
CMP	chloramfenikol
COT	kotrimoxazol
GEN	gentamycin
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NEO	neomycin
OXA	oxacilin
SUL	sulbaktam
TET	tetracyklin

1. Úvod

Staphylococcus aureus je běžným komenzálem přítomným na těle člověka. Vyskytují se však vysoce virulentní kmeny produkující různé faktory virulence, které bakteriím umožňují snadněji přežít obranné mechanismy buněk hostitelského organismu. Bakterie si závratnou rychlostí vyvinuly mechanismy rezistence k dosud známým antibiotikům. Především methicilin-rezistentní a multirezistentní kmeny *S.aureus* se výrazně podílí na prodlužování pobytu a výrazném navýšení nákladů na léčbu hospitalizovaných osob ve zdravotnických zařízeních.

2. Charakteristika rodu *Staphylococcus*

První shluky koků (*S.aureus*) v hnisu zaznamenali v roce 1880 vědci Louis Pasteur a Alexandr Ogston. Z českých vědců vynikli prof. Václav Hájek (především u psů přítomný *S.intermedius*, dále *S.muscae*, *S.saphrophyticus* subs.*bovis* a *S.chromogenes*) a doc.Pantůček (*S.simiae* diagnostikovaný u jihoamerických opic v olomoucké ZOO).

V současné době je v rodu *Staphylococcus* evidováno 50 taxonů v 39 druzích, z nich se vyskytuje devět ve dvou a jeden ve třech poddruzích (Petraš, 2007). Mnozí ze zástupců rodu *Staphylococcus* mají význam ve veterinární medicíně, u člověka se uplatňují především *S.aureus*, *S.epidermidis* a *S.haemolyticus*.

2.1 Morfologie

Zástupci rodu *Staphylococcus* jsou v mikroskopickém materiálu uspořádání v jednotlivé koky, případně tvoří dvojice, páry či krátké řetězky koků čítající maximálně o čtyřech buňkách. Typické je uspořádání ve tvaru hroznů, z jehož řeckého ekvivalentu *staphylé* (hrozen) vzniklo vlastní označení rodu. Dosahují velikosti 0,8-1,0 μm v průměru. Stafylokoky jsou nepohyblivé a nevytvářejí spory.

2.2 Stavba buněčné stěny

Barvením dle Grama rozlišujeme bakterie v závislosti na obsahu lipidů v buněčné stěně na dvě skupiny: grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). G- bakterie se po aplikaci roztoků dle Grama snadno odbarví díky rozrušení lipidických látek. G+ bakterie včetně rodu *Staphylococcus* se však neodbarví, neboť jejich buněčná stěna neobsahuje lipidy

a peptidoglykan v ní obsažený propouští působením organického rozpouštědla méně barviva.

Téměř 90% buněčné stěny G+ bakterií obsahuje peptidoglykan (murein), který je navrstven až v 25 souvislých vrstvách (Madigan et al. 2009) a zodpovídá za pevnost buněčné stěny. Peptidoglykan je považován za polysacharid, který tvoří dva deriváty sacharidů; N-acetylglukosamin a kyselina N-acetylmuramová. Složení doplňují dále aminokyseliny L-alanin, D-alanin, kyselina D-glutamová a jedna z dvojice lysin-diaminopimelová kyselina (DAP), které tvoří tetrapeptid, opakující se jednotku ve struktuře peptidoglykanu.

G+ bakterie včetně rodu *Staphylococcus* mají ve své buněčné stěně zabudovanou kyselinu teichoovou, která prostupuje jak cytoplasmatickou membránou, tak vrstvou peptidoglykanu. Teichoová kyselina je lineárním polymerem ribitolfosfátu nebo glycerolfosfátu s glykosidicky navázanými cukry (Kaprálek 1986). Teichoové kyseliny jsou kovalentně spojeny s N-acetylmuramovou kyselinou ve vrstvě peptidoglykanu. Svým nábojem přispívají k negativnímu náboji buněčné stěny a zodpovídají za vazbu Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů pro eventuální transport do buňky (Madigan et al. 2009).

2.3 Faktory virulence

Faktory virulence jsou takové chemické sloučeniny, které jsou zodpovědné za schopnost patogenu vyvolat infekci nebo čelit imunitní odpovědi makroorganismu. Dělíme je podle jejich lokalizace v buňce na povrchové a extracelulární.

2.3.1 Povrchové faktory

Hlavní součástí buněčné stěny je Protein A o velikosti 40-60 kDa, který se nespecificky váže na Fc fragment imunoglobulinu a brání tak před opsonizací protilátkami a fagocytózou. K detekci a imobilizaci imunoglobulinu se používají také bakteriální Protein G, Protein A/G a Protein L (http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_A, 6.4.2010).

Polysacharid A složený především z ribitolových podjednotek a kyseliny teichoové je významný při adhezi na povrch ran a sliznic.

Peptidoglykan zabudovaný v buněčné stěně indukuje aktivaci komplementu, shlukování trombocytů a uvolňování cytokinů z makrofágů.

2.3.2 Extracelulární faktory

2.3.2.1 *Enterotoxiny*

Enterotoxiny se vyskytují v antigenních typech A-E, G-R a v různých kombinacích tří subtypů (C1, C2, C3). Jedná se o bazické proteiny rezistentní vůči účinku proteolytických enzymů gastrointestinálního traktu. Odolávají varu po dobu 30 minut. Po požití potravy s dávkou enterotoxinů v množství asi 0,4μg/kg tělesné hmotnosti člověka vzniká alimentární otrava.

Enterotoxiny jsou považovány za superantigeny, které nevyžadují pro interakci s imunitním systémem setkání s antigen prezentujícími buňkami. Marrack a Kappler (1990) uvádějí, že enterotoxiny v komplexu s proteiny MHC II vytvářejí vazbu na podjednotce beta T—buněčného receptoru a dochází k masivní proliferaci T-lymfocytů a nespecifické zánětlivé odpovědi. Receptory ve sliznici střev jsou stimulovány neurotoxickým účinkem enterotoxinů a se zrychlenou peristaltikou střev se dostávají průjmy. Dráždění emetického centra centrální nervové soustavy vede ke zvracení.

2.3.2.2 *Epidermolytické toxiny (exfoliatiny)*

Exfoliatiny se vyskytují ve čtyřech antigenních typech. ET-A, jehož produkce je řízena chromozomálními geny, má ve své molekule zabudován atom mědi a odolává varu po dobu 20 minut. Tvorba méně termorezistentního antigenního ET-B je kódována geny na plasmidech. Účinkem exfoliatinů dochází u člověka a sajících myšat k lýze mukopolysacharidické matrix v epidermis a následnému olupování kůže či vzniku puchýřů, známému jako exfoliativní dermatitidy (epidermolýzy) nebo Stafylokokový syndrom opařené kůže (SSSS).

2.3.2.3 *Hemolyziny*

Hemolyziny jsou účinné látky, které způsobují rozklad (lýzu) erytrocytů in vitro. Podle struktury a účinků rozlišujeme čtyři typy hemolyzinů.

2.3.2.3.1 α -hemolyzin (α -toxin)

Monomer 3S díky hydrofobní vazbě na lipidy buněčných membrán lidských makrofágů a trombocytů agreguje na heptamer cylindrického tvaru, který v buněčné

membráně cílové buňky vytváří 1-2nm póry. Tvorbou pórů dochází k narušení osmotické rovnováhy a k buněčné smrti (Dingem et al. 2000).

α -hemolyzin působí antagonisticky proti hemolyzinu beta. Lidské kmeny *S.aureus* produkují často α -hemolyzin společně s hemolyzinem delta.

2.3.2.3.2 β -hemolyzin

Hemolyzin beta, který ve své molekule obsahuje kationty Mg^{2+} a Ca^{2+} , štěpí sfingomyelin obsažený v membránách erytrocytů na fosforylcholin a ceramid. Integrita erytrocytu však zůstává zachována. β -hemolyzin svým toxickým účinkem poškozuje lidské i králičí trombocyty, případně i makrofágy morčat a buněčný metabolismus a zesiluje biologický účinek hemolyzinu delta. Znakem neúplné beta hemolýzy na krevním agaru s příměsí beraních erytrocytů je zrnovité projasnění (tzv.hot-cold fenomén), které nastává jako sekundární efekt např. při ochlazení krevního agaru, nikoliv v důsledku lýzy erytrocytů (Goaux et al. 1997).

2.3.2.3.3 γ -hemolyzin

Synergohemenotropní gama hemolyzin se skládá ze dvou složek, jejichž současná přítomnost je podmínkou pro jeho biologickou aktivitu a toxicitu, která je však nižší než u α -hemolyzinu. Aby reakce proběhla, je nutná přítomnost Na^{+} nebo K^{+} iontů. γ -hemolýza není rozeznatelná na krevním agaru, neboť je agarem inhibována.

2.3.2.3.4 δ -hemolyzin

Hemolyzin delta působí jako povrchová neenzymatická látka na buněčné membrány. Svým účinkem lyzuje nejnanežji lidské erytrocyty, ale působí i na lymfocyty, makrofágy a polynukleázy. Inhibují jej fosfolipidy přítomné v séru.

2.3.2.4 *Hyaluronidáza*

Enzym hyaluronidáza (spreading factor) hydrolyzuje kyselinu hyaluronovou na menší fragmenty. Štěpením kyseliny hyaluronové, jež v extracelulárním matrix a v mukoidech pojivové tkáně vytváří antimikrobiální bariéru, se usnadňuje vstup stafylokokových toxinů do buňky.

2.3.2.5 *Leucocidin (Panton-Valentinův toxin)*

Leucocidin se skládá z pomalé (S) a rychlé (F) složky, jejichž názvy vzešly z relativní rychlosti při chromatografickém dělení. Účinkem leucocidinu je narušena iontová výměna, permeabilita a integrita buněčné membrány polymorfonukleárů, makrofágů a monocytů, která vede k buněčné smrti.

2.3.2.6 *Plasmakoaguláza*

Enzymatická plasmakoaguláza se vyskytuje v různých kombinacích osmi sérotypů (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII). S modifikovaným protrombinem plasmakoaguláza vytváří aktivní komplex, jenž přeměňuje fibrinogen na fibrin v citrátové králičí plasmě. Díky plasmakoaguláze se může vytvořit kolem zánětlivé léze fibrinový lem, který se přeměňuje ve stafylokokový absces (Petráš et al. 2008).

2.3.2.7 *Fibrinolysin (stafylokináza)*

Polypeptidický řetězec skládající se z 136 aminokyselin, stafylokináza, vykazuje fibrinolytickou aktivitu. Mechanismem napodobující fyziologickou fibrinolýzu stafylokináza aktivuje přeměnu zymogenu plasminogenu na plasmin, který štěpí fibrin i fibrinogen v krevním trombu.

2.3.2.8 *Nukleáza*

Nukleáza je termorezistentním proteinem odolávajícím zahřátí až do 100°C po dobu 15 minut, který odštěpuje z ribonukleové i deoxyribonukleové kyseliny fosfomononukleosidy.

2.3.2.9 *Toxin toxického šokového syndromu (Toxic shock syndrome toxin – 1)*

TSST-1 je superantigenem, jehož interakcí s MHC II molekulami a T-buněčnými receptory jsou masivně uvolňovány cytokin interleukin-1 a tumor necrosis factor (TNF) (Parsonet et al. 1985, 1988). Toxin toxického šokového syndromu inhibuje syntézu makromolekul v endotheliích, zesiluje účinek endotoxinu a vede k masivnímu multiorgánovému selhání v důsledku šokového stavu.

2.4 Metabolismus

Stafylokoky jsou fakultativní anaerobi, kteří rostou jak za přítomnosti kyslíku, tak i při jeho absenci. Mohou využívat proces anaerobní fermentace i aerobní respirace. Stafylokoky patří do skupiny chemoorganotrofů a jako zdroj energie využívají aminokyseliny, cukry nebo obojí, jejichž konečnými produkty za aerobních podmínek jsou především kyseliny octová a CO₂, což se využívá při diagnostických průkazech. Dále stafylokoky ve srovnání se streptokoky produkují enzym katalázu, který rozkládá peroxid vodíku (Votava 2005).

2.5 Genetika

Genom prokaryotních zástupců rodu *Staphylococcus* obsahuje jeden kružnicový chromozóm o velikosti 2700 – 2800 kpb a skupinu přídatných genetických elementů.

Kromě inzerčních sekvencí (také jako IS elementy, inzerční sekvence) genom obsahuje množství profágů a transpozonů (Votava 2003). Transpozony jsou sekvencemi DNA provádějící transpozici. Rozeznáváme Tn3 a příbuzné elementy a složené Tn-elementy, významné pro rezistenci bakterií. Pomocí enzymu transponáza jsou DNA-sekvence přemísťovány z místa donorového do místa akceptorového a zabudovávány či vyštěpovány z genomu. Během transpozice může docházet k větším strukturním změnám genomu (Rosypal 2006).

Geonomové ostrovy patogenity (Pathogenicity islands) jsou přídavnými variabilními genetickými elementy, které jsou přítomné u G+ bakterií i G- bakterií a výrazně ovlivňují patogenitu mikroorganismů včetně *S. aureus* (Hacker et al. 1997).

3. Specifika *Staphylococcus aureus*

Rozeznáváme poddruhy *Staphylococcus aureus* subs. *anaerobius*, anaerobní mikroorganismus, který u člověka nenalzáme, a *Staphylococcus aureus* subs. *aureus* (dále pouze *Staphylococcus aureus*).

3.1 Lokalizace na lidském těle

S. aureus je součástí běžné mikrobiální flóry kůže na rukou, kde odolává jak poměrně suchému, tak kyselému prostředí o pH 4-6 (Madigan et al. 2009). Dále kolonizuje

u zdravých jedinců respirační trakt zahrnující sliznici nosu a nasopharyngu, ojediněle sliznici trávicího traktu, rectum, perineum, případně vlasy.

3.2 Způsoby přenosu

Infekce se přenáší na zdravé nebo imunosupresované jedince např. porušenou celistvostí kůže či sliznic cestou přímou (přímý kontakt či kapénková infekce) nebo nepřímou (kontaminované ruce zdravotnického personálu, předměty, prach). V úvahu též přichází infekce vlastním endogenním kmenem (Bc.Šenkýřová 2006).

3.3 Nosičství a epidemiologie

Zdraví jedinci bez klinických příznaků, u nichž byla laboratorními metodami diagnostikována přítomnost *S.aureus*, se stávají nosiči. Nejzávažnějším typem je nosičství nosní, které je v 30% zachycených případů trvalé a v 70% intermitentní. V určitém čase se vyskytuje téměř u všech dětí a 40% dospělých (Marečková 2006). Asi v 10% se vyskytuje nosičství krční a v 70% kožní, okrajově na místech postižených dermatidou.

Asi u třetiny populace se vyskytuje *S.aureus* jako komensál, aniž by u postižených osob vyvolal klinické příznaky onemocnění. Kojenci do jednoho týdne věku jsou kolonizováni bakteriemi přímým kontaktem s matkou nebo blízkými osobami. Postiženy jsou osoby s narušenými tělesnými bariérami vzniklými jako důsledek traumat, zavedení jehel, katetrů, cizích těles a se sníženou odolností vzniklou např. po léčbě steroidy, léky narušující imunitu, po zraněních, vysilujících nemocech a v důsledku hormonálních změn.

4. Rezistentní kmeny MRSA

Již Alexander Fleming po svém převratném objevu penicilinu v roce 1929 ve svých pokusech popisoval necitlivost kmenů *S.aureus*, jež kultivoval ve vzrůstajících koncentracích penicilinu. Kirby (1944) ve své práci popsal kmeny *S.aureus* produkující penicilinázu. Přesto, že prevalence kmenů produkující penicilinázu výrazně vzrostla s dostupností penicilinu po 2.světové válce, byl penicilin nadále považován za lék první volby do počátku 70.let minulého století.

V současnosti si téměř každý patogen vyvinul odolnost alespoň k jednomu aplikovanému antibiotiku a s tím každým dnem vzrůstá potřeba nových, účinných antimikrobiálních preparátů z jiných skupin antibiotik.

4.1 Vymezení rezistence

Rezistence je schopnost bakteriální populace přežít inhibiční koncentrace příslušné antimikrobiální látky. V případě, že mikroorganismus postrádá transportní systémy nebo cíl pro molekulu antibiotika je mimo spektrum účinku daného antibiotika, hovoříme o tzv. *přírodní (primární) rezistenci*. Modifikací přítomného genetického materiálu v bakterii nebo získaného genetického materiálu z vnějšího prostředí vzniká tzv. *získaná (sekundární) rezistence*.

4.2 Genetika rezistence

Začleněním stafylokokové chromozómové kazety *mec* (SCC*mec*, Staphylococcal chromosome cassette methicillin-resistance islands) do genomu *S.aureus* vzniká rezistence k methicilinu (Katayama et al. 2001). SCC*mec* se skládá ze dvou genových komplexů (*mec* a *ccr*), dále z pro buňku méně významné oblasti J (junkyard) a dělí se podle obsahu různých typů těchto struktur do pěti allotypů (Frances et al. 2005).

Rezistence k methicilinu a ostatním β -laktamových antibiotikům je zprostředkována genem *mecA* ze stafylokokové chromozómové kazety *mec*, který u *S.aureus* kóduje syntézu pozměněného proteinu PBP(Penicilin-binding protein)2a, jež inhibuje navázání β -laktamových antibiotik. Vazbou β -laktamů na nemodifikovaný transpeptidázový protein PBP, který je podstatný pro úspěšnou syntézu bakteriální buněčné stěny, je syntéza inhibována a buňka umírá. Gen *mecA* však nemusí být u *S.aureus* nutně exprimován, proto nelze zcela spoléhat na kultivační testy a je nutno provádět PCR. Informace pro syntézu β -laktamázy (penicilinázy), kterou buňka užívá k enzymatické hydrolýze β -laktamového kruhu antibiotik, je kódována na plasmidu.

4.3 Přenos rezistence

Dosahuje-li frekvence spontánních mutací 10^{-8} - 10^{-9} tzn. získá-li 10^8 - 10^9 bakterie podílející se na vzniku infekce rezistenci, hovoříme o *vertikálním přenosu genů*. Tento mechanismus se uskutečňuje velmi vzácně, ale v exponenciálně rostoucí bakteriální populaci směřuje k rychlému rozšíření genů rezistence v potomstvu. Mutace na bakteriálním chromozomu poskytuje členům bakteriální populace rezistenci, přičemž v selektivním prostředí jsou rezistentní mutanti zvýhodňováni na úkor původních (divokých) typů bakterií.

Při *horizontálním přenosu genů* jsou mezi bakteriemi stejných i různých druhů přesouvány části DNA řetězců třemi mechanismy:

- Pomocí bakteriálního viru (bakteriofága) je fragment chromozomální nebo plasmidové DNA o maximální délce genomu bakteriofága přenášen mezi příbuznými bakteriemi mechanismem *transdukce*. Zvláště u *S.aureus* jsou geny pro rezistenci (R-faktory) přenášeny temperovanými fágy, jejichž nukleová kyselina je po penetraci do buňky zabudována do chromozomu a replikuje se jako profág společně s chromozomální DNA hostitelské buňky.
- Mechanismem *transformace* recipientní buňka získává DNA materiál od lyzované či mrtvé donorové buňky z vnějšího prostředí, s níž zpravidla nepřichází do kontaktu. Volná nebo DNA nesená plasmidem nemusí být pouze bakteriální, prakticky se může jednat o jakoukoliv DNA, která je po průchodu buněčnou stěnou limitovaném velikostí molekuly DNA integrována do bakteriálního chromozomu (Avery 1944).
- *Konjugaci* jsou mezi dvěma buňkami v přímém styku přenášeny pomocí mobilních genetických elementů (plasmidy, transpozony) úseky DNA. U *konjugace F-* s *F-* donorová buňka nese fertilní faktor (F-plasmid, F-faktor) a geny k tvorbě sex-pilů, kterými se pravděpodobně přesouvá i F-plasmid. Současně s replikací chromozómu se replikuje i plasmid a vytváří se jeho identická kopie pro dceřinnou buňku. Výsledkem konjugace jsou dvě buňky s F+, které spolu konjugovat již nemohou. Při *konjugaci* typu *Hfr* (z angl. high frequency of recombination) je F- faktor integrován do chromozomu a přenáší se jak geny F-plasmidu, tak chromozomu. Opustí-li F-plasmid chromozóm s geny, které jsou v jeho bezprostřední blízkosti, hovoříme o *konjugaci F'* (Votava 2005).

4.4 Mechanismy rezistence

S vývojem antimikrobiálních látek (ATB) můžeme na vlastní oči pozorovat bakteriální evoluci. Nejen, že si bakterie mohou navzájem vyměňovat genetický materiál a přispívat k vysoké variabilitě jednotlivých druhů a jejich vlastností, ale dokázaly si vyvinout účinné mechanismy k odolání vůči účinkům antibiotik:

- změnou cílové struktury pro vazbu antibiotika např. produkce modifikované PBP2a pro β -laktamová antibiotika, produkce ribozomální metylázy pro linkosamidy, makrolidy a streptograminy (Nakayama 1995)

- zvýšením výdeje (efluxu) ciprofloxacinu, chloramfenikolu a erytromycinu z buňky
- zvýšením nepropustnosti bakteriální stěny pro aminoglykosidy, tetracykliny atd.
- produkcí enzymů inaktivujících aminoglykosidy nebo β -laktamová antibiotika atd.

4.5 Možné příčiny vzniku rezistence

Tenover et al. (1996) ve své práci popisuje pravděpodobné příčiny vzniku rezistence u bakterií. Po 2.světové válce se stal penicilin běžně dostupným ve vyspělých zemích a byl hojně využíván jako „všelék“ i na nemoci nebakteriální či neinfekční. V současnosti je stále ještě možné v rozvojových zemích získat volně prodejná antibiotika, v moderním světě jsou však vydávána pouze na lékařský předpis, aby se minimalizovalo riziko zneužívání antibiotik veřejností. Lékař se mnohdy nechává ovlivnit požadavkem pacienta a zbytečně předepisuje lék. Pokud pacient nedodrží dávkovací schéma, vznikají rezistentní mutanty. Patogenní bakterie jsou tak vystaveny neškodným subinhibičním koncentracím antibiotik a následně je jimi kolonizována běžná mikrobiální flóra. Podávání antibiotika jednoho druhu vede k rychlejšímu vzniku rezistence.

Nutné je zdůraznit koloběh antibiotik v přírodě. V chovech zvířat jsou antimikrobiální látky používány jako růstové faktory např. tetracykliny a jako prevence a léčba nálezů. S výkaly zvířat se molekuly antibiotik dostávají do půdy a do podzemních vod. Jisté riziko nesou i geneticky modifikované rostliny, z nichž mohou mikroorganismy přijmout geny pro rezistenci.

4.6 Snížená citlivost a rezistence k vybraným antibiotikům

Kmeny MRSA si úspěšně vyvinuly mechanismy rezistence k účinku semisyntetického penicilinu methicilinu (v České republice v prodeji jako oxacilin), který obsahuje inhibitory bakteriálních penicilináz (β -laktamázy). Dosud však bylo identifikováno na 90 různých β -laktamáz, které úspěšně degradují nové i staré penicilinové preparáty.

V současnosti je 20-30% všech MRSA kmenů multirezistentních; během osmi desítek let používání antimikrobiálních preparátů získaly rezistenci i k dalším příbuzným β -laktamovým preparátům, mezi něž patří kromě zmíněných penicilinů i cefalosporiny, dále fluorchinolony, aminoglykosidy, chloramfenikoly, rifampiciny a tetracykliny.

V roce 1996 se v ranné infekci po operaci hrudníku u čtyřměsíčního chlapce objevily kmeny MRSA se sníženou citlivostí k vankomycinu, které vznikly patrně chromozómovou mutací, nikoli domnívaným přenosem na transpozonech enterekoků. Tyto kmeny se sníženou citlivostí k vankomycinu jsou označovány jako VISA (vankomycin-intermediate *S.aureus*), případně GISA (glycopeptide-intermediate *S.aureus*), v případě rezistence VRSA (vankomycin-resistant *S.aureus*), případně GRSA (glycopeptide-resistant *S.aureus*).

Na počátku roku 2000 byly na trh uvedeny nadějně preparáty; synergid ze skupiny streptograminů a zyvox z oxazolidinonů, MRSA kmeny však již k nim vykazují sníženou citlivost až rezistenci. Kdy získá MRSA rezistenci i k vyvíjeným antibiotikům daptomycinu, různým derivátům vankomycinu, telitromycinu z řady ketolidů a derivátu tetracyklinů glycylcyklinu, je jen otázkou času.

4.7 Nemocniční MRSA

Přítomnost multirezistentního kmene MRSA výrazně komplikuje, prodlužuje a zvyšuje náklady léčby po zákrocích provedených v nemocničních zařízeních nebo u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů se sníženou imunitou v sanatoriích, léčebnách dlouhodobě nemocných, dialyzačních centrech nebo domovech seniorů. V současnosti multirezistentní kmeny tvoří až 50% zachycených patogenů ve zdravotnických zařízeních.

4.7.1 Nosokomiální nákazy

Nosokomiální nákazy (infekce) postihují na nemocničních jednotkách intenzivní péče zhruba 30% hospitalizovaných pacientů. Rizikové faktory (používání katétrů a jiných invazivních pomůcek, pacienti s popáleninami či poraněními) zvyšují pravděpodobnost vzniku závažného onemocnění a dokonce i úmrtí pacienta (Vincent 2003).

4.7.1.1 Definice nosokomiálních nákaz

Termín „nosokomiální“ označuje infekce, kterými je nakažen pacient po 48 a více hodinách od hospitalizace. Nosokomiální infekce jsou sekundárními komplikacemi primárních onemocnění, se kterými je pacient v nemocnici léčen (Kayser et al. 2005).

4.7.1.2 Rozdělení nosokomiálních nákaz

Na základě epidemiologických a etologických aspektů dělíme nosokomiální nákazy do dvou skupin.

4.7.1.2.1 Dle epidemiologického hlediska

1) *Nespecifické* nákazy jsou odrazem epidemiologické situace dané populace ve spádové oblasti zdravotnického zařízení. Tyto choroby se vyskytují i mimo zdravotnické zařízení.

2) Za *specifické* nákazy považujeme takové choroby, které vznikly jako důsledek aplikace ošetrovatelských a léčebných postupů a vyšetřovacích metod. Výskyt tohoto typu nákaz ovlivňuje důslednost provádění sterilizace, dezinfekce a asepse ve zdravotnických zařízeních.

4.7.1.2.2 Dle etiologického agens

1) Zdrojem *endogenní* nákazy je sám pacient. Původcem nákazy je často saprofytická mikroflóra zanesená mimo místo svého běžného výskytu např. do rány, sérózních dutin atd. Vznik endogenních nosokomiálních nákaz je výrazně ovlivněn kvalitou poskytované zdravotnické péče, dodržováním zásad sterility, bariérové ošetrovací techniky, asepse, antisepte a dezinfekce a také stavem pacienta. Např. zhoršený imunitní stav u pacientů postižených primární chorobou.

2) Zdrojem *exogenní* nákazy je agens z vnějšího prostředí mimo tělo pacienta. Šíření exogenních nákaz ovlivňuje nakažová situace v okolí pacienta, ale také kvalita provedených vstupních vyšetření včetně diferenciální diagnózy (Marečková 2006).

4.7.1.3 Zdroje nákaz

Zdroji nosokomiálních nákaz mohou být:

- sám pacient v případě endogenních nákaz
- jiní pacienti, jejichž mikroflórou jsou infikovány běžné vyšetřovací nástroje a obvazový materiál, sliny, sputum, krev, kapénky vzduchu, stolice, vaginální a spojivkový sekret v případě exogenních nákaz
- zdravotnický personál postižený zdánlivě banálními nemocemi (kožní vyrážky, lehké průjmy, faryngitida atd.)

- návštěvníci či jiné osoby především na resuscitačních a neonatologických odděleních, kteří svojí neukázněností porušují hygienická opatření (donášení potravin z domova, odkládání věcí na pacientovu postel, přímý kontakt s hospitalizovanou osobou a jiné).

4.7.1.4 Rizikové faktory

Vnitřní faktory úzce souvisí s aktuálním stavem pacienta. Vlastní mikroflóra pacienta a případná imunodeficience se výrazně podílí na vzniku nosokomiálních nákaz. Největšímu riziku jsou vystaveny děti do 3 let s nedostatečně vyvinutým imunitním systémem a osoby nad šedesát let, u nichž se významně uplatňují jak vnější, tak i vnitřní rizikové faktory.

Typickými *vnějšími* faktory, které podmiňují vznik především ranných nákaz, jsou chirurgické či ortopedické operace. Ortona et al. (1987) uvádějí, že riziko vzniku nosokomiálních nákaz u akutních operací je 1,26krát vyšší než u operací dlouhodobě plánovaných. Trvá-li operace déle než jednu hodinu, u každého pátého pacienta vzrůstá riziko 1,6krát. Riziko vzniku nosokomiální infekce u čisté rány bez vlastní mikroflóry je nižší než u operací, u nichž hrozí bezprostřední kontaminace z okolí např. gastrointestinální trakt a jiné.

Při vzniku nosokomiálních nákaz se uplatňuje také virulence *S.aureus* a přítomnost jiné infekce či cizího tělesa v ráně.

4.7.2 Ranné infekce

Ačkoliv jsou ve většině zdravotnických zařízeních dodržovány přísné postupy sepsy, antisepy, antibiotické profylaxe a prevence pro minimalizaci všudypřítomných mikroorganismů, ranné infekce, které komplikují chirurgické zákroky, v současnosti tvoří až 29% všech nosokomiálních nákaz. Podle Haleye (1985) vedou ranné infekce k 57% prodloužení pobytu v nemocnicích a také navýšení finančních nákladů hospitalizace o 40%. Porušením celistvosti kůže a narušením antimikrobiální bariéry při zákrocích pronikají do rány etiologická agens včetně *S.aureus* v různé koncentraci a průběh infekce se odvíjí jak podle virulence agens, tak odolnosti hostitele.

WHO (1981) rozděluje operační rány do několika skupin podle možné přítomnosti mikroorganismů:

- *čisté rány chirurgické* bez vlastní mikroflóry mimo gastrointestinální, urogenitální a respirační trakt např. operace kýly, prsu, varixů, strumy atd. Novák (2001) uvádí, že riziko vzniku ranné infekce u rány čistého typu čítá 0,6-5,8%. Zachycena je však jen část infekcí kvůli zkracování pobytu pacientů po zákrocích v nemocnicích, přičemž drtivá většina infekcí manifestuje 4.-10.den po zákrocích.
- *čisté rány chirurgické kontaminované* endogenní mikroflórou bez zánětu (gastrointestinální, urogenitální a respirační trakt). Riziko vzniku dosahuje 3-11%.
- *rány chirurgické kontaminované* často doprovázené zánětem, např. akutní operace tlustého střeva, tumoru nebo krvácení do žaludku, operace močového traktu atd. s pravděpodobností vzniku 10-17% .
- *rány znečištěné* např. traumatické nebo jiné porušení kůže, vznikají s rizikem nad 27%

4.7.3 Infekce krevního řečiště

Stafylokoky velmi snadno adherují na povrch styku dvou fází a vytváří na něm tenkou slizovitou vrstvu, biofilm. U pacientů se zavedenými cizími předměty se může osídlení stát rezervoárem patogenních bakterií, neboť bakterie v biofilmech jsou chráněny proti účinkům antibiotik dosud málo popsáným mechanismem. Výzkum Bureše et al. (2009) prokázal, že vhodnou volbou materiálu aplikovaných předmětů např. potažením chlorhexidin-stříbrem lze infekce související se zaváděním katetrů, kanyl a kloubních náhrad úspěšně minimalizovat. Richards et al. (1999) udává, že hlavními etiologickými agens, které se podílí na rozvoji infekcí krevního řečiště, jsou koaguláza-negativní stafyloky (36%), nasledované enterokoky (16%) a konečně *S.aureus* (13%).

Zanesením *S.aureus* krevní cestou z dýchacích cest do endokardu může vzniknout na povrchu chlopní *infekční endokarditida*. Mortalita pacientů s infekční endokarditidou dohazuje 25-40% (Baddour et al. 2005).

4.7.3.1 Sepsis

Za sepsi považujeme těžký stav, který je spojený s přítomností bakterií v krevním řečišti tzv.bakteriemií. Pro soubor klinických příznaků doprovázejících sepsi bývá také používáno označení septický syndrom. Septický šok je syndrom charakterizovaný inadekvátní perfuzí důležitých orgánů a svalové tkáně vyvolaný bakteriemi nebo účinkem

jejich toxinů. Mortalita u sepsie dosahuje 20-60% a u septického šoku 60-90% (Ziegler et al 1991).

Na rozvoji sepsie se mohou podílet různá etiologická agens, viry, houby i bakterie. G+ bakterie jsou zodpovědné za 30-40% všech sepsí s lepší prognózou oproti G-bakteriím. *S.aureus* stojí za vznikem sepsí z osteomyelitid, akutních endokarditid, z raných popálenin a ranných infekcí.

Zdroje sepsí mohou být *intravaskulární* jako endokarditidy, infekce žil a tepen atd. a *extravaskulární*, které představují rány, furunkly, invazivní zákroky, záněty tělních dutin, abscesy a podobné. Bakterie z extravaskulárních zdrojů pronikají do krevního řečiště přes nedostatečně funkční lymfatické uzliny v důsledku expanze patogenní bakteriální populace, tlaku z otoku nebo vysoké virulence mikroorganismu.

Reakcí makroorganismu je masivní produkce makrofágů a cytokinů (tumor necrosis factor (TNF) a interleukin-1) z endotelových buněk a lymfocytů. Běžnými klinickými symptomy sepsie jsou zvýšená teplota, leukocytóza, úprava metabolismu a hemodynamiky.

Siegel et al. (1979) definovali na základě metabolických a klinických aspektů čtyři typy stadií sepsí:

- Při *kompenzované sepsi* stoupá spotřeba kyslíku, katabolismus svalové tkáně, vzestup glukagonu, inzulínu, katecholaminů a glukokortikoidů, pacient má horečku.
- Ve stadiu *metabolické insuficience (hyperkinetické stadium)* se dostavuje tachykardie, tachypnoe, překrvení pokožky, vysoká horečka a podstatné navýšení glukagonu v krvi jako důsledek vystupňování metabolismu v tkáních, zvýšená produkce laktátu a s tím spojená acidóza, která je kompenzována hyperventilací.
- Ve stadiu *orgánové selhání* vlivem extrémní vazodilatace prudce klesá krevní tlak, prohlubuje se acidóza a objevuje se respirační insuficience.
- Pro *stadium studeného šoku (terminální)* je typické současné selhání dvou a více orgánů (multiorgánové selhání), selhávání metabolismu a chladná a vlhká kůže.

4.7.4 Nosokomiální pneumonie

Nosokomiální pneumonie je druhou nejčastější nosokomiální nákazou. Incidence dosahuje 4-50 případů na 1000 hospitalizací. U pacientů na jednotkách intenzivní péče (JIP) vyjádřená incidence vzrůstá až desetkrát a u pacientů připojených endotracheální

intubací na umělou plicní ventilaci více než dvacekrát. Čím déle je pacient připojen na ventilaci, tím stoupá riziko nákazy; 6.5% v 10 dnech, 19% v 20 dnech a 28% v 30 dnech. V 33% případů pneumonií se jako etiologické agens uplatňuje *S.aureus* (Fagon et al. 1989). Výraznou komplikací vedoucí z prodloužení léčby je vznik abscesů a empyému.

4.8 Komunitní MRSA

Nezávisle na nemocničních kmenech MRSA se rozvinuly infekce i u osob, které nebyly během posledních 14 dní hospitalizovány, nepodstoupily dialýzu, drobné chirurgické nebo ortopedické zákroky a katetrizaci. Tyto infekce mohou být způsobovány komunitními kmeny MRSA (cMRSA). Komunitní MRSA se velmi snadno šíří ve společnostech, které přicházejí do přímého styku, např. ve sportovních týmech, ve věznicích, v armádě, ale také v běžných komunitách mladšího věku. S komunitními MRSA se setkávají mladí lidé průměrného věku 23 let, kdežto s nosokomiálními nákazami průměrného věku 68 let (Naimi et al. 2003).

Asi v 75% jsou infekce lokalizovány na kůži a měkkých tkáních obvykle s velmi dobrou prognózou. Dosud však není jasné, proč je léčba kožních infekcí některých pacientů úspěšná, ačkoliv u jiných pacientů s tímtéž kmenem selhává. Zvýšená virulence komunitních kmenů vede k rychlejšímu rozšíření infekce do různých orgánů a k následné životohrožující sepsi, pneumonii a syndromu toxického šoku.

4.8.1 Komunitní pneumonie

Torres et al. (1997) popisuje komunitní pneumonie jako zánětlivé onemocnění plicního parenchymu, které postihuje alveoly, bronchioly a intersticiu. Onemocnění je vyvoláno běžnými patogeny včetně *S.aureus* u osob, které v posledních 14 dnech nenavštívily zdravotnické zařízení nebo u pacientů do dvou dnů od počátku hospitalizace. Podle Kašáka (2007) komunitní pneumonie tvoří 80-90% všech případů pneumonie a 20-30% vyžaduje neodkladnou hospitalizaci. Petráš et al. (2007) ve své práci uvádějí, že kmeny *S.aureus* s produkcí Panton-Valentinova leukocidinu úzce souvisí s akutním průběhem pneumonie doprovázené tvorbou abscesů, nekrózy a sepse s úmrtností až 75%.

4.8.2 Syndrom toxického šoku

Podle Todda (1990) je syndrom toxického šoku (Toxic shock syndrome, TSS) spojován s operacemi nosní dutiny a menstrujícími ženami, které používají vysoce

absorpční tampony. Optimální prostředí s přítomností krve tvoří ideální mikroprostředí, které je kolonizováno *S.aureus* z rukou. Dostaví se horečky, zvracení, průjmy a vyrážky, které až v 70% případů končí smrtí. V současnosti se objevuje syndrom toxického šoku také i u mužů, především po chirurgických zákrocích (Madigan et al. 2009). Nutné je však rozlišovat etiologické agens (*S.aureus* či *Streptococcus pyogenes*).

4.8.3 Otravy jídlem

Stafylokokové enterotoxikózy (otravy jídlem) jsou způsobeny kontaminací potravy enterotoxiny. Samotný mikroorganismus však nemusí být v potravě přítomen (Madigan et al. 2009). Nákaza vzniká často z drůbežního masa a příbuzných výrobků, pečiva plněného krémem či pudingem, vajec a salátových dresingů. Po 1-6 hodinách po pozření se objevuje nevolnost a zvracení. Během následujících 48 hodin jsou enterotoxiny z těla vylučovány. Díky poměrné tepelné stabilitě je enterotoxin aktivní i po opakovaném ohřátí jídla.

4.8.4 Kožní infekce

Za nejvíce nakažlivé hnisavé kožní onemocnění (pyodermie) je považováno *impetigo*. Nejčastěji jsou postiženy děti předškolního a mladšího školního věku, mezi nimiž se infekce velmi rychle a snadno šíří na prstech rukou a přes lůžkoviny hlavně v létě. Na pokožce kolem nosu a úst se objevují praskající puchýře s mokrou spodinou, jež jsou kryté žlutými strupy z provaleného tkáňového moku. Velmi snadno se rozšiřují na ostatní povrch těla (Vosmík 1995). Pronikne-li infekce do horní části vlasového folikulu podrážděného např. holením, vzniká *folikulitida* a v okolí vousu *sykoza*. Není-li folikulitida včasně léčena, dochází k trvalé ztrátě folikulu. *Furunkl (nežit)* se vytvoří, prostoupí-li infekce do hlubších oblastí vlasového folikulu a dochází k nekróze okolní parenchymatické tkáně. Obzvláště nebezpečné je zanesení infekce na nosní sliznici a poté do mozku s následným hnisavým zánětem mozkomíšních blan. Pokud dojde ke splnutí několika furunklů, vzniká *karbunkl*, jehož léčba vyžaduje kromě podávání antibiotik i chirurgický zásah (Halem et al. 2006).

4.9 Léčba

Pro odstranění subjektivních potíží, které v podobě nemoci manifestují u pacienta, je nutné používat symptomatickou terapii. Většinou je nutné aplikovat analgetika, antipyretika a sledovat iontovou rovnováhu v séru. V úvahu též přicházejí chirurgické zákroky.

4.9.1 Chirurgické zákroky

Menší abscesy se zpravidla hojí spontánně. U větších abscesů je však nutné chirurgické vyprázdnění, neboť hrozí provalení dutinky obsahující infekci, hnis a okolní zanícenou tkáň dovnitř těla. Po incizi se zavede drén (gázový, rukavicový, hadicový), jehož funkcí je odvod sekretů rány a zamezení předčasnému uzavření rány. Je však nutné drén nanejvýš za 3 dny (podle závažnosti průběhu infekce) po zavedení čistit a měnit.

4.9.2 ATB terapie

Pro zjištění citlivosti bakterie k vybraným antibiotikům se používá *Kirby-Bauerův test (kvalitativní disková difúzní metoda)*. Na Mueller-Hintonův agar v Petriho miskách se inokuluje bakteriální suspenze a po zaschnutí suspenze se na misku nanese papírové disky namořené zvolenými antibiotiky. Kolem disku s antibiotikem, vůči němuž je bakterie citlivá, se po 24hodinové kultivaci vytvoří inhibiční zóna. Na základě porovnávání naměřené hodnoty inhibiční zóny se stanovenými hodnotami se zjišťuje, zda je bakterie citlivá či rezistentní. Pro zjištění bližších koncentrací antibiotika, vůči němuž bakterie vykazují citlivost, užíváme kvantitativní *diluční bujonovou metodu*. Do mikrotitrační destičky, v jejíž jamkách je bujón s antibiotikem, rozplňujeme geometrickou řadou bakteriální suspenzi o zákalu 1, 5-3 stupně McFarlandovy stupnice (Urbášková 1997).

Lékem první volby kvůli rezistenci MRSA k β -laktamovým antibiotikům jsou glykopeptidy. Používání vakomycinu je s přihlédnutím k reportovaným případům snížené citlivosti (VISA) nebo dokonce rezistence (VRSA) a značné toxicitě přípravku omezováno a nahrazováno teikoplaninem, který snadněji proniká do měkkých tkání, pŕýchŕřů i kostí. Také linezolid z oxazolidinonů kvůli malé molekule lehce proniká do tkání. Diskutabilní je použití antibiotik s inhibitory β -laktamáz: augmentin (amoxicilin + klavulonát), timentin (tikarcilin+klavulonát) a unasyn (ampicilin + sulbaktam). Z dalších antibiotik lze na základě testů citlivosti podat cefalosporiny III.generace, flourochinolony, quinupristin-

dalfopristin (Synercid), trimethoprimum/sulfamethoxazolium (Biseptol) a v jiných zemích daptomycin (Cubicin).

Podle závažnosti kožních lézí se zvažuje léčba chirurgická, antibiotická a dezinfekční lokálními prostředky. Vhodné jsou jodové preparáty s pomalým uvolňováním jódu např. Inadin, Braunol, Betadin a z ostatních Octenisept, Skinsept atd. (Petkov 2006).

4.10 Hygienická opatření

V případě pozitivního nálezu MRSA je bezpodmínečně nutno přistoupit k několika hygienickým opatřením ve zdravotnickém zařízení, aby se zabránilo rozšíření infekce mezi ostatní pacienty a personál.

4.10.1 Izolace

Pacient je umístěn na oddělení, na němž byl primárně hospitalizován, do samostatného pokoje či boxu. V případě, že je více pacientů kolonizováno stejným kmenem, mohou být umístěni na společném pokoji, přičemž pokoj musí být označen zřetelným nápisem „Izolace“ nebo „Infekční pokoj“. Do dokumentace pacienta je podle zvyklostí zdravotnického zařízení poznamenáno „MRSA“. Veškerá dokumentace zůstává mimo izolační pokoj, pouze v případě hospitalizace pacientů na jednotkách intenzivní péče se ponechává u lůžka pacienta, aby se s chorobopisy co nejméně manipulovalo.

4.10.2 Bariérová ošetřovací technika

MRSA pozitivní pacienti jsou ošetřováni bariérovou ošetřovací technikou. Pro zamezení diseminace nákazy je nutností výrazně omezit vstup osob na pokoj. K izolovanému vstupují pouze ty osoby, které se bezprostředně podílí na péči o pacienta, nikoliv rodinní příslušníci či medici. Podle kapacit nemocnice může být na tyto úkony i zvláště vyčleněný personál. Zaměstnanci zdravotnického zařízení včetně techniků a konziliářů musí být s bariérovým režimem seznámeni a dodržovat ho.

Před vstupem do pokoje si vstupující umyje ruce antibakteriálním mýdlem, osuší je a během 30-60 sekund vetře dezinfekční roztok s obsahem alkoholu. Dávkovač s pákovou baterií musí být umístěn na pokoji a v případě boxové izolace přímo u lůžka. Poté ošetřující oblékne jednorázové *ochranné pracovní pomůcky*, které zahrnují plášť,

rukavice, ústenku, galoše a někdy i přikrývku vlasů. Použité ochranné pomůcky jsou odkládány do plastových pytlů a likvidovány jako infekční odpad.

Veškeré věci osobní potřeby je nutné denně podrobovat dezinfekci. Použité nádoby nesmí být vynášeno z izolačního pokoje, aniž by nebylo dezinfikováno 0,5% roztoky přípravků Quatohex a Hexaquartus plus nebo 0,5% roztokem persterilu. Nástroje se přímo v pokoji dekontaminují přípravky s prokázanou účinností na MRSA (Promanum N, Softa-Man). Denně se mění ložní prádlo, jež je poté ukládáno do plastových pytlů s označením „Infekční“ a odesíláno k dezinfekci, případně ještě na pokoji může být dekontaminováno 0,5% roztokem persterilu nebo 4% roztokem chloraminu. Pacienti, kteří jsou schopni pohybu, musí mít k dispozici vlastní WC a koupelnu. Intimní prostředky (bažanti, podložní mísy) jsou po každém použití dezinfikovány 4% roztokem chloraminu (Marečková 2006).

Dezinfekce hrubých povrchů se provádí 3x denně za použití persterilu. Hrubé dezinficiens je však nutné pravidelně střídat.

5. Laboratorní a diagnostické metody

5.1 Odběr materiálu

Odběry materiálu od pacienta (výtěry) se nejčastěji provádí výtěrovými tampony. Pro uchování bakterií je vhodné používat transportní média např. Amiesovo s anorganickými solemi, agarem, aktivním uhlím a thioglykolátem sodným nebo Stuartovo bez aktivního uhlí.

Pro výtěr ze spojivkového vaku, ucha se užívá výtěrového tamponu na drátku. Moč odebíráme v objemu 3-5 ml do sterilní zkumavky. Pro odběr sputa pacient zakašle do odběrové nádoby se šroubovacím uzávěrem („sputovka“). Punkáty, ascites, exsudáty, empyém, nekrotická tkáň, katetry, kanyly a pleurální tekutina mohou být odebírány do sterilních zkumavek, anaerobních nádobek nebo injekčních stříkaček. Mozkomíšní mok je odebírán lumbální punkcí v nejmenším objemu 3ml, nejlépe 5-10ml u dospělých a 4-5ml u dětí do dvou plastických sterilních zkumavek. Krev v objemu 20-30ml (u dětí 6ml) na hemokultury se odebírá do hemokultivačních lahviček se zátkou ošetřenou 70% alkoholem, před odběrem se provede stěr z místa vpichu, který se taktéž odešle ke kultivaci (Marečková 2006).

5.2 Transport vzorků

Transport vzorků do mikrobiologické laboratoře musí být dostatečně rychlý (do 2h, při dodržení veškerých zásad do 24h) a ke vzorkům šetrný, nejlépe při teplotě 8-12°C. Doporučuje se, aby byly transportní nádoby umístěny nejlépe ve svislé poloze a v pevné a nepropustné nádobě. V případě extrémních vnějších teplot je nutno nádoby přepravovat v boxech, které zamezí znehodnocení vzorku (např. boxy s chladicími vložkami, temperování boxu na pokojovou teplotu). Nejrychleji hynou nejvíce náročné bakterie a ve vzorku se úspěšně pomnoží bakterie běžné flóry. Všechny nádoby musí být řádně označeny a doprovázeny řádně vyplněnou žádankou k mikrobiologickému vyšetření.

5.3 Kultivace

Jednotlivé druhy bakterií je v laboratorních podmínkách (in vitro) možno makroskopicky rozlišit podle vlastností narostlých kultur na kultivačních půdách. Přesto, že tyto postupy neposkytují okamžité výsledky, jsou směrodatné pro další léčbu pacientů.

5.3.1 Optimální kultivační podmínky

S.aureus je poměrně nenáročným mikroorganismem schopným růstu v širokém teplotním rozmezí od 7 do 48,5°C s růstovým optimem od 30 do 37°C (Schmidt et al. 1990) a při pH 4,2-9,3 s optimem pH 7-7,5 (Bergdoll 1989). Petriho misky s pevnými půdami a zkumavky s tekutými půdami s naočkovanými kulturami kultivujeme v termostatu po dobu 18-24 hodin při obvyklých 35-37°C, případně prodlužujeme dobu kultivace až na 72 hodin.

5.3.2 Kultivační média

Různé typy bakterií vyžadují pro optimální růst různé složení půd. Tato média se liší v obsahu bílkovin, aminokyselin, výtažků např. z hovězího masa, přítomností antibiotik k regulaci nežádoucích bakterií a přídatnými substancemi jako jsou erytrocyty, žlučové soli či uhlí.

5.3.2.1 Pevné půdy

Na běžném masopeptonovém agaru (MPA) *S.aureus* vytváří po 24 hodinách kultivace v průměru 1-3 mm velké neprůhledné kolonie s krémovitou konzistencí, rovnými

okraji, hladkým povrchem a nazlátlým pigmentem. Po 72 hodinách kultivace dosahují velikosti 3-8mm.

Nejvhodnějším kultivačním médiem pro růst *S. aureus* je *krevní agar*. K základnímu masopeptonovému (živnému) agaru, který obsahuje extrakt z hovězího masa, pepton, chlorid sodný, vodu a 1,5-2% agar, je přidáno 5-10% defibrinovaných beraních či koňských erytrocytů. Na krevním agaru vyrůstá *S. aureus* v koloniích bílé až nažloutlé barvy s úzkou zónou β -hemolýzy.

Ze selektivních půd pro patogenní stafylokoky se používá *manitolový slaný agar*, jež obsahem 7,5% NaCl inhibuje růst ostatních mikroorganismů. Po 36 hodinách kultivace jsou patrné nápadné kolonie stafylokoků obklopené žlutou zónou, kolonie ostatních mikroorganismů jsou drobnější a obklopené červenou nebo fialovou zónou (Ayres et al. 1995). Vhodnou selekční půdou je chromogenní *MRSA-select*, která obsahuje NaCl k podpoře růstu stafylokoků, inhibiční oxacilin, cefoxitin a fungicidin. V případě pozitivity mají kolonie nazelenalou barvu jako indikátor produkce α -glukosidády. Selektivní *CNA agar* obohacený o kolistin, který inhibuje růst G- bakterií a *Pseudomonas*, a kyselinu nalidixovou k inhibici *Protea*, je vhodný ke kultivaci *S. aureus*.

Na půdě Mueller-Hinton obsahující masový extrakt, kyselý hydrolyzát kaseinu, škrob a agar provádíme testy citlivosti k antibiotikům. Pro náročnější bakterie se využívá Mueller-Hintonova půda obohacená o aminokyseliny a hemoglobin.

5.3.2.2 Tekuté půdy

Masopeptonový (živný) bujón obsahuje masovou infuzi, 1% roztok peptonu a 0,5% NaCl. Základem masopeptonového bujónu pro náročnější mikroorganismy včetně *S.aureus* může být i mozkosrdcová infuze s přídatkem 6,5% NaCl. Pozitivita je charakterizována typickým zákalem bujónu, k němuž u negativnímu nebo nenaočkovaného bujónu nedochází.

5.3.3 Hemokultury

Hemokultivace se provádí u pacientů s příznaky sepse a těžké sepse, u pacientů s infekcemi nejasné lokalizace a u infekcí, kde je velmi nesnadné provádět odběr materiálu na běžnou kultivaci. Přístroj Bactec, do něhož se lahvičky s hemokulturami vkládají, detekuje při růstu bakteriální populace CO_2 , který je odpadem bakteriálního metabolismu.

5.4 Koagulázové testy

Podstatnými testy pro diferenciaci *S.aureus* jsou testy na produkci koagulázy:

- Průkaz pro *volnou koagulázu* se provádí v aglutinační zkumavce. K lyofilizované králičí plasmě přidáváme 8ml fyziologického roztoku, 0,5ml plazmy a několik kolonií tetovaného bakteriálního kmene. Směs důkladně promícháme, inkubujeme 3h při 37°C a druhý den odečítáme výsledek. Pokud je reakce pozitivní, vytváří se ve zkumavce chuchvalce či sraženiny (fibrinová zátka).
- Test pro *vázanou koagulázu (clumping factor)* se provádí na podložním sklíčku.

5.5 Latexová aglutinace

Na podložní sklíčko nanášíme kromě negativní kontroly i kapku bakteriální suspenze a latexové reagens; na molekulu latexu je navázán fibrinogen, gamma globulin (IgG) a monoklonální protilátka proti polysacharidům pouzdra *S.aureus*. U opouzdřených kmenů reakcí s antigenem proti pouzdru dochází k aglutinaci. V případě, že bakterie ztratila pouzdro, aglutinace probíhá v reakci s fibrinogenem a IgG.

5.6 Mikroskopie

Barvení dle Grama vynalezené v roce 1884 je dosud jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších metod používaných k diferenciaci G+ a G- bakterií na základě odlišných vlastností buněčné stěny. Tato diagnostická metoda byla modifikována Huckerem (1921). V současnosti se nejčastěji využívá modifikace dle Nowyho (Moyes et al. 2009):

- Na odmaštěné podložní sklo v tenké vrstvě asepticky naneseeme bakteriální suspenzi a necháme ji na suchém vzduchu případně vysoko nad plamenem zaschnout.
- Pro snadnější obarvení bakterií, jejich zahubení a přichycení k podložnímu sklíčku preparát fixujeme 3x krátkým protažením plamenem kahanu a necháme jej zchladnout.
- Na 1-3 minuty preparát přelijeme roztokem krystalové violeti, poté necháme přebytek bez oplachování okapat.
- Krystalovou violet převrstvíme Lugolovým roztokem na 1-3 minuty, poté roztok z podložního skla slijeme, opláchneme jej destilovanou vodou a odbarvujeme acetonem nebo etanolem dokud z preparátu odtéká barvivo.

- Preparát opláchneme destilovanou vodou a dobarvujeme safraninem nebo karbolfuchsinem po dobu 30-60 sekund.
- Preparát opláchneme destilovanou vodou a necháme zaschnout na suchém vzduchu, nad plamenem kahanu nebo jemně osušíme filtračním papírem.

Hotový preparát pozorujeme imerzním objektivem na optickém mikroskopu. G- bakterie, které se velmi snadno odbarví acetonem a dobarví karbolfuchsinem nebo safraninem díky propustnosti buněčné stěny pro komplexy s jodem, mají v mikroskopickém materiálu červenou barvu. G+ včetně *S.aureus* komplexy nepropouští a mají modrofialovou barvu.

6. Cíle práce

Cílem této práce je nejen poskytnout zájemcům aktualizované informace o problematice výskytu MRSA ve zdravotnických zařízeních – především ve spádové oblasti laboratoře Laboma, ale také ověřit vybranými diagnostickými metodami v laboratoři, zda je možné odlišit patogenní kmen s předpokládanou rezistencí od kmene běžného.

6.1 Vymezení spádové oblasti

Spádovou oblastí pro sběr vzorků laboratoře Laboma s.r.o. České Budějovice je Jihočeský kraj a Pacovsko. Vzorky v příslušných nádobkách s médii jsou systematicky vyzvedávány od praktických lékařů, kteří nemají k dispozici vhodného dopravce k transportu vzorků.

6.2 Metody

K získání dat jsem použila databázi zdravotnického zařízení a statistických metod.

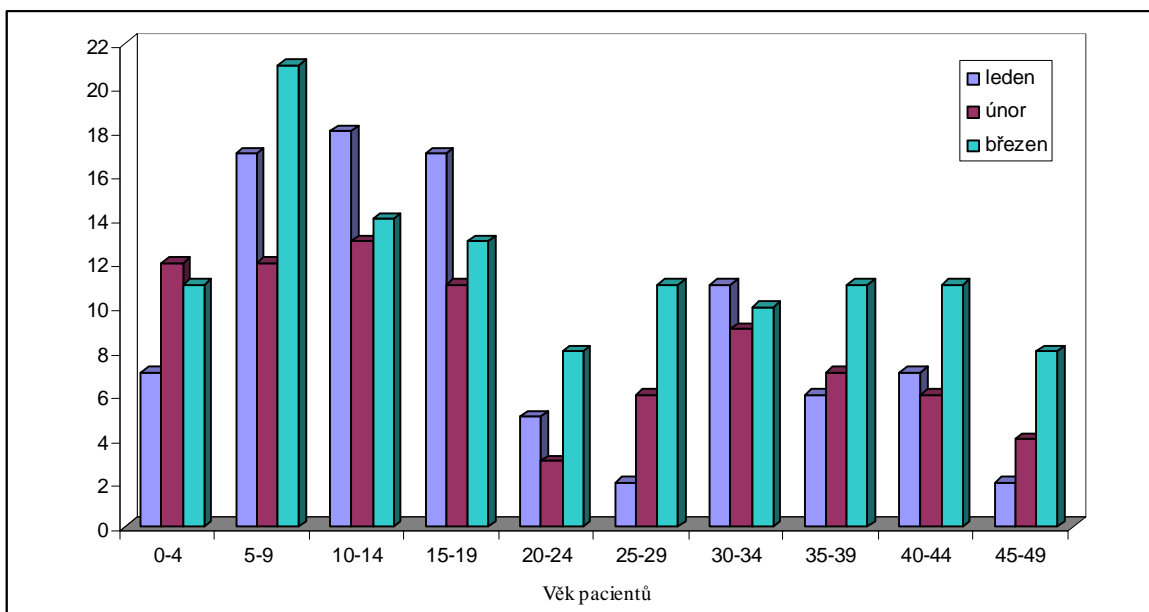
Pro experimentální confirmaci dat jsem použila různé typy kultivačních půd, na nichž jsem ověřila typické vlastnosti vybraného druhu (*S.aureus* a MRSA). Za aseptického přístupu jsem na sterilní Petriho misky s vylitými kultivačními půdami (krevní agar a MRSA-select agar) nanasla metodou křížového roztěru pomocí bakteriologické kličky kolonie nepatogenního *S.aureus* a potenciálního kmene MRSA. Na Mueller-Hintonovy půdy jsem vlila suspenze obou vzorků, nechala oschnout a raznicí na půdu vložila disky s antibiotiky (oxacilin, tetracyklin, erytromycin, augmentin, kotrimoxazol, cefazolin). Petriho misky jsem nechala kultivovat po dobu 24h při 37°C v termostatu.

7. Výsledky

V měsících leden-březen 2010 bylo v mikrobiologické laboratoři Laboma zachyceno 425 vzorků se *S.aureus*, u nichž byly pomocí diskové difúzní a diluční metody provedeny testy citlivosti k vybraným antibiotikům.

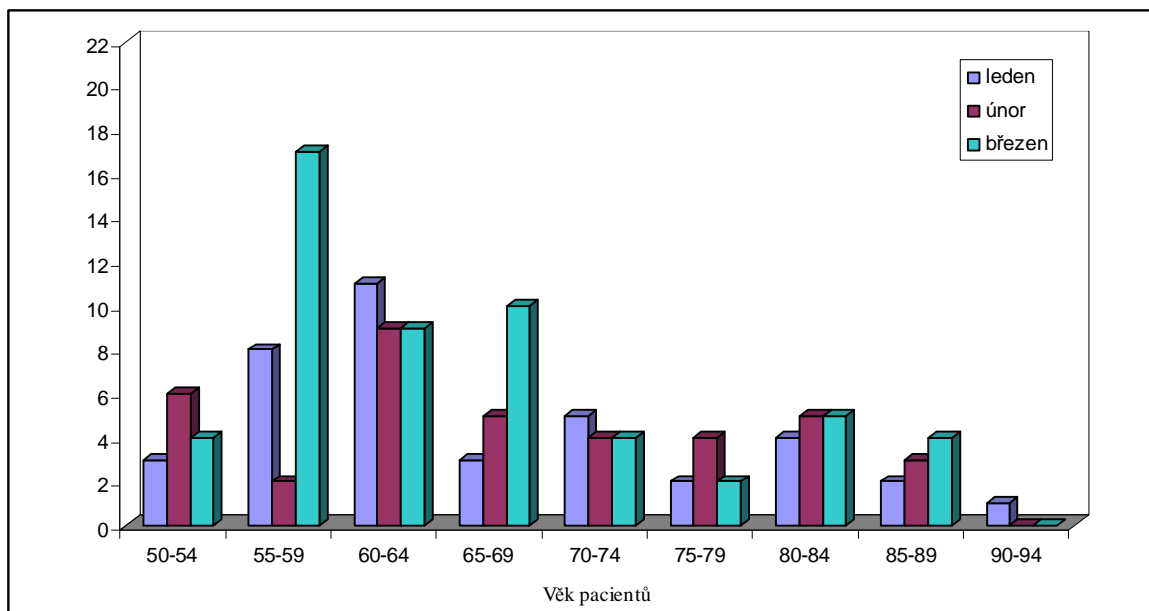
Na základě získaných dat jsem vyhodnotila, jaké věkové skupiny pacientů mají největší pravděpodobnost získání rezistence k vybraným antibiotikům. Věkové skupiny jsou pro lepší sledovatelnost rozděleny do období po pěti letech, v grafech není zohledněno pohlaví.

7.1 Grafické znázornění

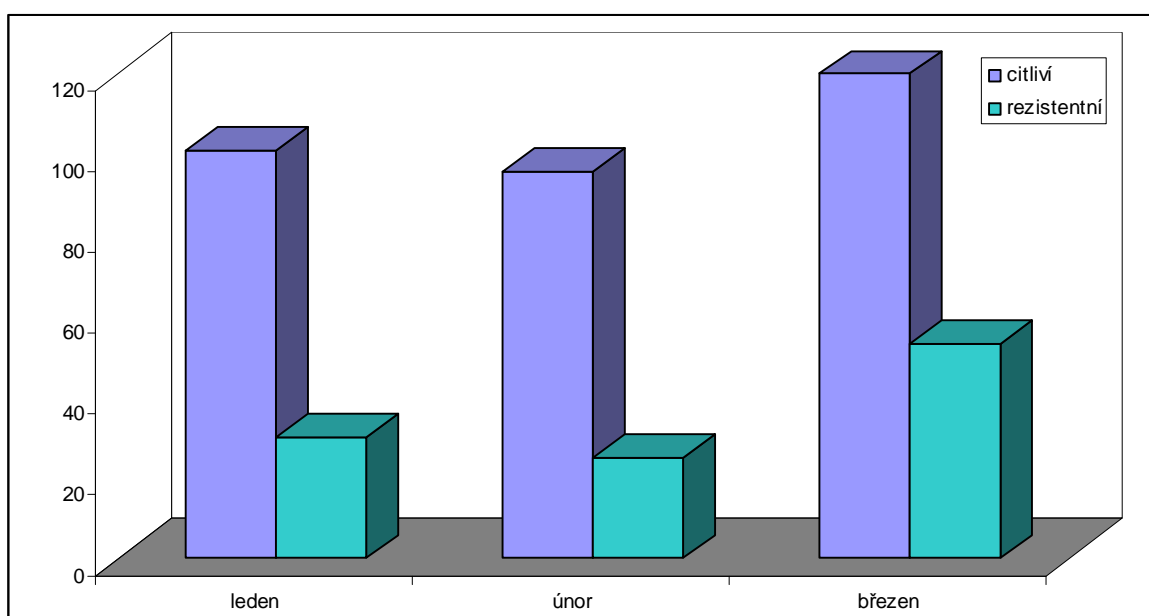


Obr.1: Testy citlivosti k antibiotikům provedené v období leden-březen 2010 u pacientů od 0 do 49 let.

Zdrojem vlastní výzkum.

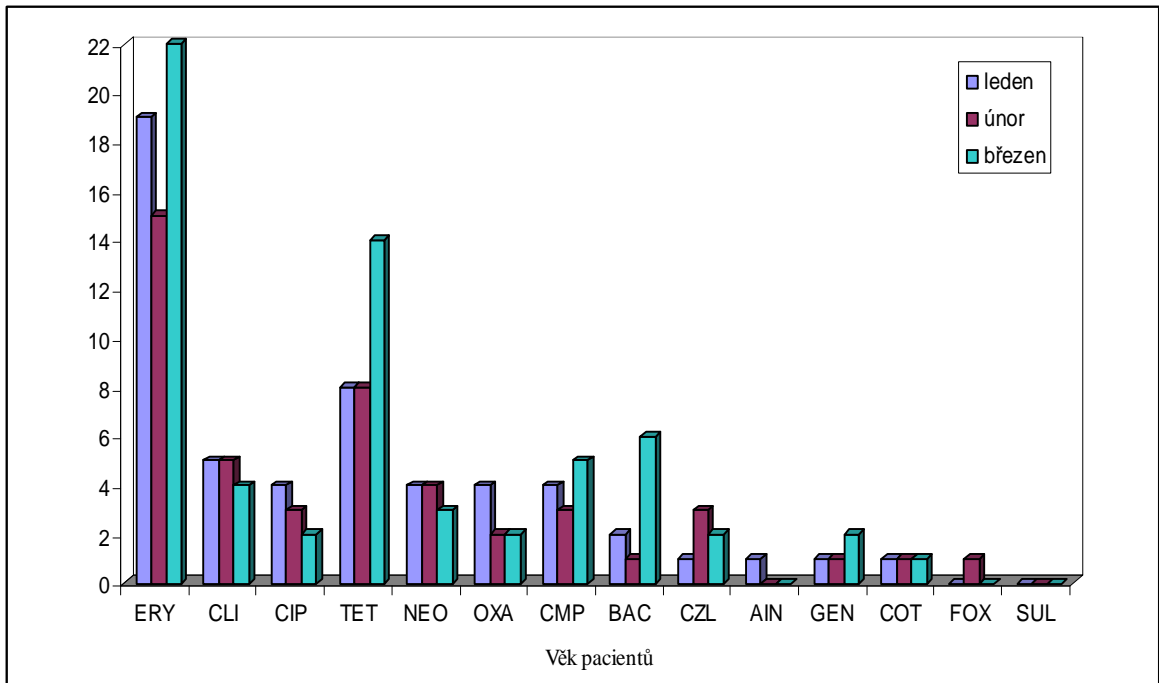


Obr.2: Testy citlivosti k antibiotikům provedené v období leden-březen 2010 u pacientů od 50 do 94 let. Zdrojem vlastní výzkum.



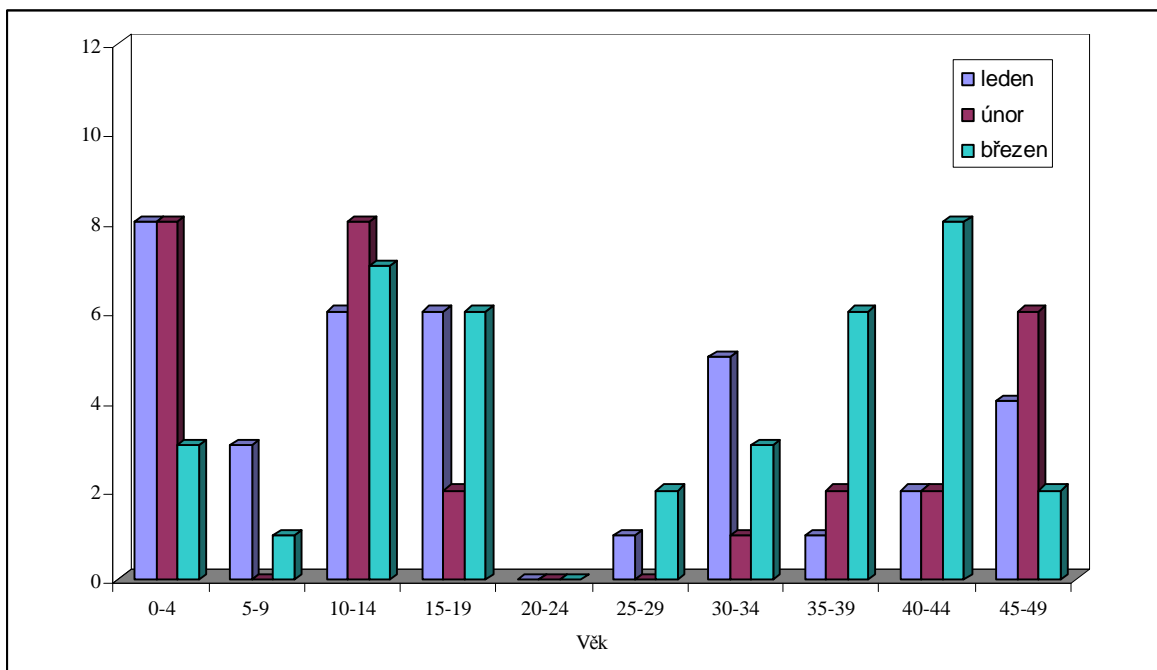
Obr.3: Poměr pacientů citlivých k antibiotikům a k rezistentním alespoň jedním preparátem v období leden-březen 2010.

Zdrojem vlastní výzkum.



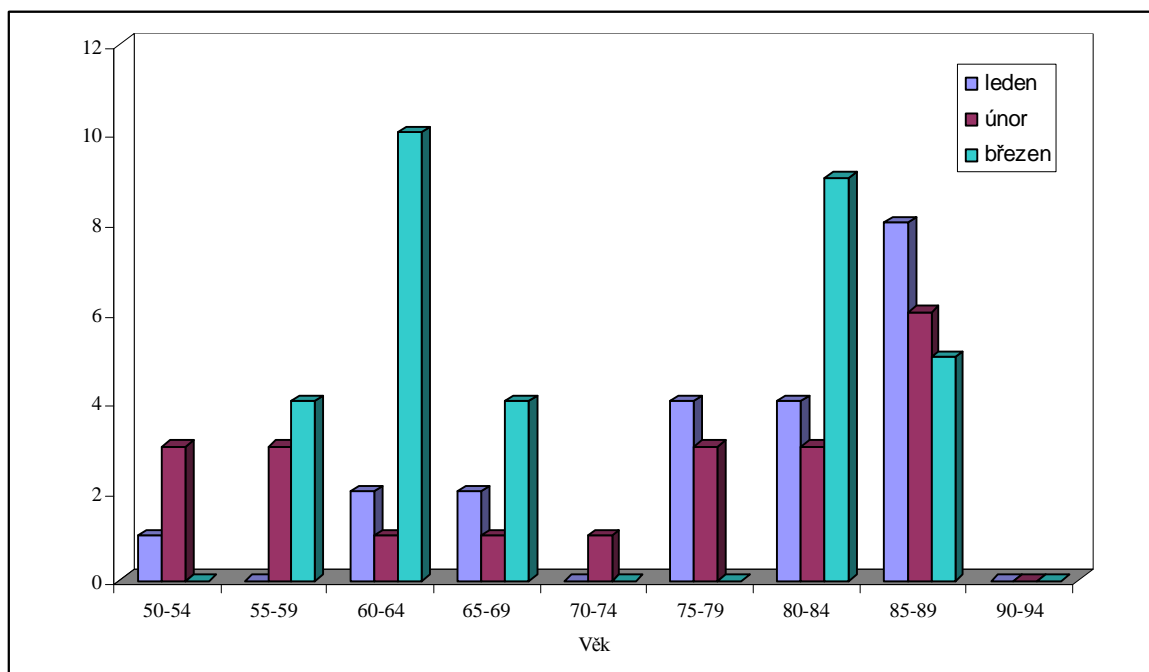
Obr.4: Rezistence k jednotlivým antibiotikům v období leden-březen 2010.

Zdrojem vlastní výzkum.



Obr.5: Rezistence k antibiotikům (ERY, CLI, CIP, TET, NEO, OXA, CMP, BAC, CZL, AIN, GEN, COT, FOX, SUL) ve věkových skupinách 0-49 let v období leden-březen 2010.

Zdrojem vlastní výzkum.



Obr.6: Rezistence k antibiotikům (ERY, CLI, CIP, TET, NEO, OXA, CMP, BAC, CZL, AIN, GEN, COT, FOX, SUL) ve věkových skupinách 50-94 let v období leden-březen 2010.

Zdrojem vlastní výzkum.

7.2 Kultivace

Po 24 hodinách kultivace vyrostly na krevním agaru z obou vzorků kolonie nazlátlého tvaru obklopené nápadnou zónou hemolýzy. Půda MRSA-select detekovala přítomnost methicilin-rezistentního kmene se zelenavým zbarvením kolonií.

Testy citlivosti na Mueller-Hintonově půdě prokázaly velmi dobrou citlivost nepatogenního *S.aureus* ke zvoleným antibiotikům. Methicilin-rezistentní kmen vykazoval předpokládanou rezistenci k oxacilinu a dále erytromycinu.

8. Diskuse

Hlavním cílem této práce bylo získat přehled dat a z nich vyhodnotit, které věkové skupiny jsou nejrizikovější z hlediska přítomnosti rezistentních kmenů. Ze 425 vzorků, u nichž byly provedeny testy citlivosti k antibiotikům, vykazovalo 318 citlivost ke všem aplikovaným antibiotikům. Zbytek, 107 vzorků, vykazovalo známky rezistence. Rezistentní mutanty vykazují nejčastěji rezistenci vůči erytromycinu, tetracyklinu a klindamycinu (viz. Obr.4).

Rezistence v jednotlivých věkových skupinách byla pozoruhodná a kojenců, batolat a mladšího předškolního věku (0-4), mladšího a staršího školního věku (5-19) a u seniorů vysokého stáří (viz. Obr. 5,6). Jako možná příčina onemocnění u malých dětí je infekce z okolí přenášena např. na ruku nebo nízká imunitní odpověď. Z Obr.1 a 2 lze odečíst, že např. dětí do 4let je záchyt rezistentních kmenů ve srovnání s počtem odběrů vzorků poměrně nízký. Bohužel se však často vyskytují multičetné rezistence.

Z osmi zachycených rezistencí vůči oxacilinu (MRSA) bylo 50% právě u pacientů nad 70 let. U starých lidí přicházejí v potaz nosokomiální nákazy spojené s dlouhodobými pobyty v léčebnách dlouhodobě nemocných, domech důchodců, případně ve zdravotnických zařízeních. Jednou z možností, jak tento stav eliminovat, je důsledně dbát na hygienu nejen pacienta, rukou, povrchů, věcí osobní potřeby a lůžkovin. Otázka antimikrobiální terapie již byla diskutována v příslušných kapitolách.

Nápadný je vzrůst počtu zachycených pacientů s alespoň jednou prokázanou rezistencí v březnu 2010. Tato hodnota dosahuje téměř 48% (viz. Obr.2) a předpokládám, že v letních měsících může opět vzrůst.

9. Závěr

Veškeré bakterie včetně *S.aureus* jsou součástí každého z nás. Jinak neškodní komensálové mohou výrazně komplikovat léčbu, přispívat k úmrtnosti a zvyšovat náklady na zdravotní péči. Je proto pouze na člověku, jak bude k těmto okem neviditelným mikroorganismům přistupovat. Jistým krokem vpřed proti multirezistentní organismům je dodržování epidemiologických opatření a hygienických zásad. Také omezení plýtvání antibiotiky, jejich zbytečné předepisování, dodržování dávkovacích schémat a průběžný vývoj nových léků je účinným opatřením proti vzniku rezistentních kmenů.

Informace, které jsou v této práci obsaženy, dosvědčují závažnost tohoto problému. Posláním této práce bylo nejen poskytnout přehled základních charakteristik, ale také varovat před potenciálním nebezpečím z mikrosvěta. Doufám, že tyto cíle práce jistě splnila.

10. Seznam použité literatury

ANDO, E., MONDEN., K., KARIYAMA, R., KUMON, H. (2004). Biofilm formation among methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates from patients with urinary tract infection, *Acta Medica Okayama* ,2004, Volume 58, Issue 4, 207-214.

AVERY, O., MCLEOD, C.M., MCCARTY, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance including transformation of pneumococcal types, *The Journal of Experimental Medicine*, 1944, Issue 79, 137-158.

AYRES, W., DUDA, J. (1995). Device and procedure for identifying pathogenic microorganism, *Biotechnology Advances*, 1995, Volume 13, Issue 4, 775.

BADDOUR, L.M., WILSON, W.R., BAYER, A.S., FOWLER, V.G., BOLGER, A.F., LEVISON, M.E., FERRIERI, P., GERBER, M.A., TANI, L.Y., GEWITZ, M.H., TONG, D.C., STECKELBERG, J.M., BALTIMORE, R.S., SHULMAN, S.T., BURNS, J.C., FALACE, D.A., NEWBURGER, J.W., PALLASCH, T.J., TAKAHASCHI, M., TAUBERT, K.A. (2005). Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Statement for Healthcare Professionals From the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: Endorsed by the Infectious Diseases Society of America, *Circulation*, 2005, Issue 111, 394-433.

BERGDOLL, M.S., D'AOUST, J.-Y., DOYLE, M.P., GILBERT, R.J., HAUSCHILD A.H.W., KAZMI, S.H., KOBURGER, J.A., KRAMER, J.M., LABBE, R. (1989) *Foodborne bacterial pathogens*, 2nd edition, Crc, New York

BUREŠ, J., BEROUŠEK, J., CVACHOVEC, K. (2009). Katétrem způsobené infekce krevního řečiště, *Anesteziologie a intenzivní medicína*, 2009, Volume 20, Issue 3, 149-152.

DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Volume 13, Issue 1, 16-34.

FAGON, J.Y., CHASTRE, J., DOMART, Y., TROUILLET, J.L., PIERRE, J., DARNE, C., GIBERT, C. (1989). Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques, *The American review of respiratory disease*, 1989, Volume 139, Issue 4, 877-884.

GOUAUX, E., HOBAUGH, M., SONG, L. (1997). alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure, *Protein Science*, 1997, Volume 6, Issue 12, 2631-2635.

HACKER, J., BLUM-OEHLER, G., MÜHLDORFER, I., TSCHÄPE, H. (1997). Pathogenicity island of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution, *Molecular Biology*, 2008, Volume 23 Issue 6, 1089 – 1097.

HALEM, M., TRENT, J., GREEN, J., KERDEL, F. (2006). Community-Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Skin Infection, 2006, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery, Medical Dermatology*, Volume 25, Issue 2, 68-71.

HALEY, R.W., ACHABERG, D.R., CROSSLEY, K.B. (1981). Extra Charles and prolongation of stay attributable to nosocomial infection: A prospective interhospital comparison, *American Journal of Medicine*, 1981, Issue 70, 51-58.

HUCKER, G.J. (1921). A New Modification and Application of the Gram Stain, *Journal of Bacteriology*, 1921, Volume 6, Issue 4, 395–397.

ITO, T., MA, X.X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase ccrC, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, Volume 48, Issue 7, 2637-2651.

KAPRÁLEK, F. (1986). *Fyziologie bakterií*, 1.vyd., Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

KATAYAMA, J., ITO, T., HIRAMATSU, K. (2001). Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin- Resistant *Staphylococcus haemolyticus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, Volume 45, Issue 7, 1955-1963.

KAYSER, F.H., BIENZ, K.A., ECKERT, J., ZINKERNAGEL, R.M. (2005). *Medical Mikrobiology*, 10th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P. (2009). *Brock Biology of Microorganism*, (10th edition), Pearson Education, Sansome.

MAREČKOVÁ, J. (2006). *Ošetrovatelské diagnózy v NANDA doménách*, 1.vyd., Grada Publishing, Praha 7.

MOYES, R.B., REYNOLDS, J., BREAKWELL, D.P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain, 2009, *Current Protocols of Microbiology*, appendix 3:3C.

NAIMI, T.S., LEDELL, K.H., COMO-SABETTI, K., BORCHARDT, S.M., BOXRUD, D.J., ETIENNE, J., JOHNSON, S.K., VANDENESCH, F., FRIDKIN, S., O'BOYLE, C., DANILA, R.N., LYNFIELD, R. (2003). Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *The Journal of American Medical Association*, 2003, Volume 290, Issue 22, 2976-2984.

NAKAJAMA, Y. (1995). Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 1995, Volume 5, Issue 2, 61-74.

ORTONA, L., FEDERICOL, G., FANTONIL, M., ARDITO, F., BRANCA, G., CAPONERA, S., SPAGNOLO, N. (1985). A study on the incidence of nosocomial infections in a large University hospital, *European Journal of Epidemiology*, 1985, Volume 1 Issue 2, 94-99.

PARSONET, J., GILLIS., Z.A. (1988). Production of tumor necrosis factor by human monocytes in response to toxic shock syndrome toxin-1, *The Journal of Infectious Diseases*, 1988, Volume 158, 1026-1033.

PARSONET, J., HICKMAN, R.K., EARDLEY, D.D., PIER, G.B. (1985). Induction of interleukin-1 by toxic shock syndrome toxin-1, *The Journal of Infectious Diseases*, 1985, Volume 151, 514-522.

PETKOV, V. (2006). Problematika a terapie polyrezistentních bakteriálních kmenů, *Bulletin České společnosti hepato-pankreato-biliární chirurgie*, 2006, Issue 4.

PETRÁŠ, P. (2007). Jubilejní padesátý stafylokok, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Zprávy CEM*, 2007, Volume 16, Issue 7, 314-317.

PETRÁŠ, P., RUMLEROVÁ, M., MACHOVÁ, I., NEKVINDA, P. (2008). Letální abscedující pneumonie vyvolaná *Staphylococcus aureus* oxacilin rezistentní s produkcí Antonova-Valentinova leukocidinu, *Praktický lékař*, 2008, Volume 88, Issue 4, 236-239.

RICHARDS, M.J., EDWARDS, J.R., CULVER, D.H., GAYNES, R.P. (1995). Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System, *Critical Care Medicine*, 1999, Volume 27, Issue 5, 887-892.

ROSYPAL, S. (2006). Úvod do molekulární biologie Díl první, 4.vyd., Rosypal, Brno.

SCHMITT, M., SCHULER-SCHMID, U., SCHMIDT-LORENZ, W. (1990). Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods, *International Journal of Food Microbiology*, 1990, Volume 11, Issue 1, 1-19.

SIEGEL, H.H., CERRA, F.B., COLEMAN, B. (1979). Psychological and metabolic correlations in human sepsis, *Surgery*, 1979, Issue 86, 163-192.

ŠENKÝŘOVÁ, V. (2006). Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, Urologie pro Praxi, 2006; Volume 5, 250–252.

ŠRÁMOVÁ, H. (1995). Nozokomiální nákazy, 1.vyd., Maxdorf-Jesenius, Praha 4.

TENOVER, F.C., MCGOVAN, J.E. (1996). Reasons for the Emergence of Antibiotic Resistance, The American Journal of the Medical Sciences, 1996, Volume 311, Issue 1, 9-16.

TODD, J.K., FERGUSON M.A. (1989). Toxic shock syndrome associated with *Staphylococcus aureus* sinusitis in children, The Journal of Infection Diseases, 1990, Issue 161, 953-955.

TORRES, A., EL EBIARY, M., RUIZ, M., RIQUELME, R., ANGRILL, J. (1997). Severe community-acquired pneumonia, Clinical Intensive Care, Volume 8, Issue 2, 69-75.

Urbášková, P. (1997). Rezistence bakterií k antibiotikům - vybrané metody, 1.vyd., Trios, Praha.

VINCENT, J.L. (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units, Lancet, 2003, Volume 361, Issue 9374, 2068-2077.

VINCENT, J.L., SIHARI, D.J., SUTER, P.M., BRUINING, H.A., WHITE, J., NICHOLAS-CHANOIN, M.-H., WOLFF, M., SPENCER, R.C., HEMMER, M. (1995). The Prevalence of Nosocomial Infection in Intensive Care Units in Europe, Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study, The Journal of American Medical Association, 1995, Volume 274, Issue 8, 639-644.

VOBROVÁ, R. (2008). Charakteristika a výskyt methicilin rezistentních izolátů bakteriálního druhu *Staphylococcus aureus* (MRSA) z krve pacientů nemocnic ČR a Evropy, Bc, Thesis.

VOSMÍK, F. (1995) Nemoci kůže, 1.vyd., Grada Publishing, Praha.

VOTAVA, M., ČERNOHORSKÁ, L., HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V., MEJZLÍKOVÁ., L., ONDROVČÍK, P., RŮŽIČKA, F., DVOŘÁČKOVÁ, M., WOZNICOVÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O. (2003). Lékařská mikrobiologie speciální, 1.vyd., Neptun, Brno.

VOTAVA, M. (2005). Lékařská mikrobiologie obecná, 2.vyd., Neptun, Brno.

ZIEGLER, E.J., FISCHER, C.J., SPRUNG, C.L. (1991). Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1a human monoclonal antibody against endotoxin, New English Journal of Medicine, 1991, Volume 324, Issue 14, 429-436.

11. Přílohy



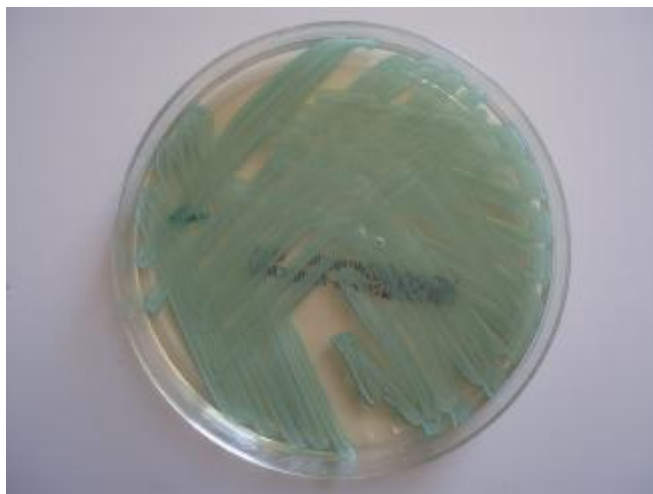
Obr. 1: Nepatogenní *S.aureus* na krevním agaru. Zdroj: vlastní.



Obr. 2: MRSA na krevním agaru. Zdroj: vlastní.



Obr. 3: Nepatogenní *S.aureus* na selektivní půdě MRSA-select. Zdroj: vlastní.



Obr. 4: Methicilin-rezistentní kmen na selektivní půdě MRSA-select. Zdroj: vlastní.



Obr. 5: Difúzní test citlivosti na Mueller Hintonově půdě. *S. aureus* je citlivý ke všem zjišťovaným antibiotikům. Zdroj: vlastní.



Obr. 6: Difúzní test citlivosti na Mueller Hintonově půdě. Přítomný je oxacilin-rezistentní kmen. Zdroj: vlastní.